



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 08 041 A 1**

⑤ Int. Cl.⁷:
C 07 K 14/62
A 61 K 38/17

②① Aktenzeichen: 199 08 041.0
②② Anmeldetag: 24. 2. 1999
④③ Offenlegungstag: 31. 8. 2000

DE 199 08 041 A 1

⑦① Anmelder:
Höcker, Hartwig, Prof. Dr., 52076 Aachen, DE

⑦② Erfinder:
Brandenburg, Dietrich, Prof. Dr., 64385
Reichelsheim, DE; Havenith, Chantalle,
Dipl.-Chem., 52062 Aachen, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Kovalent verbrückte Insulindimere

DE 199 08 041 A 1

Beschreibung

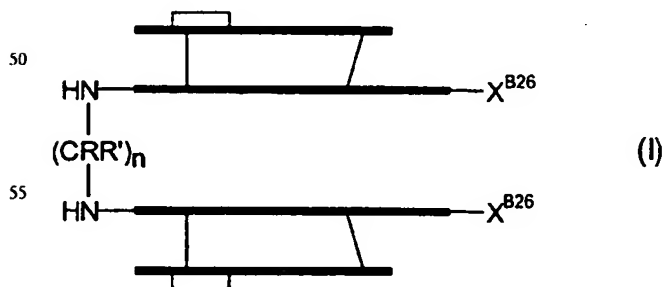
Das Proteohormon Insulin wird in den β -Zellen der Langerhansschen Inseln gebildet. Zu seiner wichtigsten physiologischen Wirkung gehört die Senkung des Blutzuckerspiegels. Insulinmangel führt zu dem komplexen Krankheitsbild des Diabetes mellitus (Typ I), das durch einen abweichenden Glukosestoffwechsel charakterisiert ist. Zur Behandlung von Diabetes mellitus werden Insulin und Insulinanaloga in pharmazeutischen Zubereitungen eingesetzt. Bei der gebräuchlichsten Therapieform, der Substitutionstherapie, wird Insulin subcutan verabreicht. Als häufigste Nebenwirkung tritt dabei die Hypoglykämie (Unterzuckerung) auf.

Trotz der stetigen Entwicklung pharmazeutischer Insulinzubereitungen für die Diabetestherapie wird ständig nach neuen Insulinanaloga gesucht, die vielversprechend im Hinblick auf ihre Wirksamkeit in Kombination mit der Reduzierung von Nebenwirkungen sind. So synthetisierten Forscher der Fa. Eli Lilly beispielsweise durch Vertauschen der Aminosäuren Prolin^{B28} und Lysin^{B29} das schnellwirkende "Insulin lispro" (EP 0 383 472 B1). Novo Nordisk entwickelte dagegen durch Fettsäure-Acylierung an der ϵ -Aminogruppe des Lysins^{B29} ein langwirkendes Insulinderivat (J. Markussen, S. Havelund, P. Kurtzhals, A. A. Andersen, J. Halstrøm, E. Hasselager, U. D. Larsen, U. Ribel, L. Schäffer, K. Vad, I. Jonassen, *Diabetologia* 1996, 39, S. 281-288). Zwar läßt sich der zeitliche Verlauf der Insulinwirkung durch derartige Abwandlungen der nativen Struktur des humanen Insulins beeinflussen, wesentliche Probleme sind jedoch noch nicht gelöst: Es gibt noch kein therapeutisch anwendbares Insulinanalogon, welches durch auch nur partielle Gewebsspezifität, insbesondere eine Hepatoselektivität, eine gezieltere, den physiologischen Bedingungen entsprechende Therapie erlaubt. Ebensovienig ist ein Analogon bekannt, das infolge größerer Wirkstärke in geringeren Mengen als Humaninsulin oder tierisches Insulin nativer Struktur eingesetzt werden könnte.

Bei sämtlichen Insulinen, die zur Behandlung von Diabetes eingesetzt werden, handelt es sich immer um monomere Insulinmoleküle mit einer Molmasse um 6000. Alle monomeren Insulinanaloga und -derivate haben sich als partielle oder volle Agonisten des Insulins erwiesen (S. Gammeltoft, *Physiol. Rev.* 1984, 64, S. 1321) und zeigen eine enge Korrelation zwischen Rezeptorbindung und Auslösung des biologischen Signals. Nur in wenigen Fällen, wie beispielsweise bei kovalent verbrückten Insulindimeren, wurde eine Diskrepanz zwischen Rezeptorbindung und biologischer Aktivität beobachtet (A. Schüttler, D. Brandenburg, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1982, 363, S. 317-330, M. Weiland, C. Brandenburg, D. Brandenburg, H. G. Joost, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87, S. 1154-1158). Weiterhin haben sich die Insulindimere zur Differenzierung von Insulinrezeptoren in verschiedenen Geweben bewährt (M. Bremer, M. Weiland, W. Becker, D. Müller-Wieland, R. Streicher, M. Fabry, H. G. Joost, *Molecular Pharmacology* 1993, 44, S. 271-276). Damit sind sie von grundsätzlicher Bedeutung für die Diagnostik in pathologischen Fällen.

Bei allen bisher beschriebenen Dimeren handelt es sich um die kovalente Verbrückung zweier Insuline in ihrer nativen Länge. Insulindimere sind prinzipiell für die Therapie von besonderem Interesse, da sie im Tierexperiment eine relative Hepatoselektivität zeigen (demonstriert für B1,B1'-Suberoyl-Insulindimer mit nativer Insulinstruktur, F. Shojae-Moradie, N. C. Jackson, M. Boroujerdi, D. Brandenburg, P. H. Sönksen, R. H. Jones, *Diabetologia* 1995, 38, S. 1007-1013) und damit eine physiologischere Senkung des Blutzuckerspiegels erlauben als alle zur Zeit in der Diabetestherapie eingesetzten Insuline. Das dort eingesetzte B1,B1'-Suberoyl-Insulindimer hat jedoch eine wesentlich geringere Bioaktivität in vitro als Rezeptorbindung (28,8% gegenüber 157-199%, M. A. Tatnell, R. H. Jones, K. P. Willey, A. Schüttler, D. Brandenburg, *Biochem. J.* 1983, 216, S. 687-694). Das Verhältnis Bioaktivität zu Rezeptorbindung ist also mit 0,15-0,18 sehr niedrig. Über eine Anwendung bzw. Weiterentwicklung dieser Befunde in Richtung Diabetestherapie ist uns nichts bekannt.

Wir haben jetzt neuartige Insulindimere konzipiert und synthetisiert, die aufgrund ihrer Eigenschaften vielversprechend im Hinblick auf eine Lösung der oben genannten Probleme und eine verbesserte Diabetestherapie sind. Dabei ist gegenüber der bisherigen Therapie mit monomeren Insulinen das einzigartige an unserem Ansatz, daß kovalent verbrückte Insulindimere als Grundstruktur dienen, bei denen die C'-Termini der B-Ketten verkürzt und in Position B26 modifiziert sind. Diese neuen Insulindimere besitzen eine Verbrückung an den N-terminalen Aminogruppen der B-Kette, die aus einer linearen oder einer verzweigten bifunktionellen Carbonsäure besteht. Die Dimere lassen sich mit der allgemeinen Formel I beschreiben:



von welcher

X = O-Alkyl, O-Aryl, NRR', Aminosäure oder deren Derivat, Alkyl- oder Arylest

R, R' = H, NH₂, Alkyl- oder Arylest

n = 0, 1, 2, ...

Die Dimere werden in bekannter Weise durch Verbrücken von zwei gegebenenfalls partiell geschützten monomeren Molekülen mit der voraktivierten Dicarbonsäure hergestellt (A. Schüttler, D. Brandenburg, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1982, 363, S. 317-330). Die monomeren Analoga lassen sich mittels enzymkatalysierter Semisynthese gewinnen (siehe Erfindungsbeispiele).

Verglichen mit Humaninsulin und monomeren Insulinanaloga zeichnen sich die erfindungsgemäßen Dimere durch

besonders hohe Affinität zu Insulinrezeptoren und Superpotenz in vitro aus, letztere bis zum zwanzigfachen der Insulinwirkung.

Im Gegensatz zu den bisher bekannten kovalenten Insulindimeren weisen die neuartigen Dimere sehr hohe Bioaktivitäten auf. Das Verhältnis von Bioaktivität zu Rezeptorbindung ist mindestens 2, teilweise sogar 4 bis 5. Sie sind damit biologisch wesentlich effektiver. Vergleicht man diese Quotienten mit denen des in der Literatur beschriebenen B1,B1'-Suberoyl-Dimeren, ergibt sich mindestens ein Faktor von 11 (0,18 : 2), und maximal von 28.

Die mit den erfindungsgemäßen Insulindimeren erzielten Vorteile bestehen vor allem darin, daß

1. gegenüber Insulin und allen zur Zeit therapeutisch eingesetzten Analoga mit einer relativen Hepatoselektivität und damit einer physiologischeren Wirkungsweise (primärer Wirkort Leber und nicht Peripherie) zu rechnen ist,
2. gegenüber bisher bekannten Insulindimeren erstmalig eine wesentlich verbesserte biologische Effektivität vorhanden ist,
3. die im Vergleich zu Insulin und monomeren Analoga wesentlich erhöhte biologische Aktivität sich bei der Anwendung sehr vorteilhaft erweisen kann, da ein äquivalenter Effekt mit deutlich geringeren Mengen an Wirkstoff zu erreichen wäre.

Erfindungsbeispiele

Abkürzungen

Ac	Acetat (CH ₃ COO)	
Äq.	Äquivalente	
Alox	Aluminiumoxid (Al ₂ O ₃)	
AS	Aminosäure	25
CZE	Kapillarzonen-elektrophorese	
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin	
DMF	Dimethylformamid	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl	30
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol	
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie	
MALDI	Matrix-assisted Laser desorption/ionization	
MPLC	Mitteldruckflüssigchromatographie	
Msc	Methylsulfonyloxycarbonyl	35
MW	Molekulargewicht	
NaOH	Natriumhydroxid	
NMM	N-Methylmorpholin	
RP	reversed phase	
ONSu	N-Oxysuccinimid ester	40
Sub	Suberoyl	
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-4-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat	
TEA	Triethylamin	
TFA	Trifluoressigsäure	
TOF	time of flight	45
TPCK	Tosyl-L-phenylalanyl-chlormethylketon	
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan	

Erfindungsbeispiel 1

Synthese von B1,B1'-Sub-[Sar^{B26}]-Des-(B27-B30)-insulin-B26-amid Insulindimer

Synthese des Tetrapeptids Gly-Phe-Phe-Sar-NH₂

Die Peptidsynthese erfolgte an einem 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)-phenoxy Harz unter Verwendung der Fmoc-Schutzgruppen-technik. Die zur Kupplung verwendeten Fmoc-Aminosäureester wurden nach der TBTU/HOBt-Methode gebildet und im 3-molaren Überschuß, bezogen auf die nominale Harzbeladung, eingesetzt. Die Peptidsynthese erfolgte nach folgendem Syntheseprotokoll:

	Nr.	Operation	Reagenzien / Lösungsmittel	Zeitdauer	Wiederholungen
5	1	Anschwellen des Harzes	DMF	1 min.	einmal
10	2	Abspaltung der Fmoc-Gruppe	20% Piperidin in DMF	6 min.	dreimal
	3	Waschen	DMF	0,5 min.	dreimal
	4	Waschen	2-Propanol	0,5 min.	zweimal
15	5	Kaiser Test*			
	6	Anschwellen des Harzes	DMF	1 min.	einmal
20	7	Kupplung der AS	3 Äq. Fmoc-AS, jeweils 3 Äq. TBTU, HOBt und 4,5 Äq. NMM in 5 ml DMF	45 min.	einmal
25	8	Waschen	DMF	0,5 min.	dreimal
	9	Waschen	2-Propanol	0,5 min.	zweimal
	10	Kaiser Test**			
30	11	Anschwellen des Harzes	DMF	1 min.	einmal
	12	Blockierung nicht umgesetzter Amino-Endgruppen	400 µl Ac ₂ O und 200 µl DIPEA in 5 ml DMF	10 min.	einmal
35	13	Waschen	DMF	0,5 min.	
40	14	Waschen	2-Propanol	0,5 min.	

*) fahre fort, wenn der Test positiv ist

45 **) fahre fort, wenn der Test negativ ist. Ist das Testergebnis allerdings positiv, wiederhole dann die Schritte 6-9.

Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgte acidolytisch durch Zugabe 10 ml der Abspaltungslösung aus 95% TFA, 4% H₂O und 1% Triethylsilan als Kationenfänger. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Harz abfiltriert und
50 gründlich mit Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde bis zur Trockene eingeeengt.

Die weitere Reinigung des Peptids erfolgte mittels RP-MPLC Säulenchromatographie mit einem linearen 2-Propanol Gradienten (0-40% 2-Propanol in jeweils 400 ml 0,07% TFA Start- und Zulaufpuffer). Als stationäre Phase diente Nucleosil 20-C₁₈. Die Flußrate betrug 180-200 ml/h (82,6% Ausbeute).

55 Semisynthese von [Sar^{B26}]-Des-(B27-B30)-insulin-B26-amid

Das Insulin mit verkürztem C-Terminus der B-Kette wurde durch enzymatische Kupplung des Tetrapeptids an N^α1-Msc-Des-(B23-B30)-insulin synthetisiert. Dazu mußte zunächst natives Insulin enzymatisch zu DOI abgebaut werden, welches anschließend partiell mit einer Schutzgruppe versehen wurde.

60

Synthese von Des-(B23-B30)-insulin

300 mg (51,66 µmol) Insulin werden in 60 ml Reaktionspuffer (0,05 M Tris, 1 mmol CaCl₂) aufgenommen. Nach Einstellen des pH Werts auf 9,5 mit festem Tris wird der proteolytische Abbau durch Zugabe von 16 mg TPCK-behandeltem
65 Trypsin gestartet. Es werden ca. 6 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert, wobei die Reaktion mittels RP-HPLC kontrolliert wird. Die Reaktion wird durch Zugabe von 4 ml Eisessig gestoppt und der Reaktionsansatz am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Aufarbeitung erfolgt zunächst über eine Sephadex G-25f- und anschließend über eine Sephadex G-50f-Gelfiltration. Das Produkt wird lyophilisiert (73,3% Ausbeute). MW: 4865

Synthese von N^αA¹-(Msc)-Des-(B23-B30)-insulin

300 mg (61,66 μmol) Des-(B23-B30)-insulin werden unter Zusatz von 225 μl TEA in 22,5 ml DMSO gelöst. Unter leichtem Rühren wird eine Lösung von 18 mg (67,86 μmol) Msc-ONSu in 5 ml DMSO hinzugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 20 min. wird die Reaktion durch Zugabe von 750 μl Eisessig gestoppt und die Reaktionslösung 16 h bei 4°C gegen entmineralisiertes Wasser dialysiert. Das Retentat wird gefriergetrocknet. Zur weiteren Reinigung werden eine Ionenaustausch-Chromatographie an SP-Sephrose (pH 3; 350 ml Startpuffer, 350 ml 0,09 M NaCl-Zulaufpuffer) und Entsalzung über Sephadex G-25f durchgeführt. Das Produkt wird lyophilisiert (30,8% Ausbeute). MW: 5015,16

Typische Kupplung von Gly-Phe-Phe-Sar-NH₂ an N^αA¹-(Msc)-Des-(B23-B30)-insulin

132,75 mg (300 μmol) Gly-Phe-Phe-Sar-NH₂ und 150,45 mg (30 μmol) N^αA¹-Msc-Des-(B23-B30)-insulin werden in 2 ml DMF (über Alox gerührt), 2 ml 1,4-Butandiol und 400 μl 0,05 M Ca(CH₃COO)₂-Lösung gelöst bzw. suspendiert. Mit NMM wird der apparente pH auf 6,7–7,0 eingestellt. Anschließend werden 23 mg TPCK-behandeltes Trypsin, gelöst in 100 μl 0,05 M Ca(CH₃COO)₂-Lösung, dem Reaktionsgemisch zugefügt. Während der Reaktionszeit wird der Verlauf der Reaktion mittels RP-HPLC verfolgt und der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls mit NMM nachgestellt. In 4,5 h läßt sich ein Umsatz von knapp 90% erzielen. Die Reaktion wird durch Zugabe von 4,5 ml 30%iger Essigsäure gestoppt. Das Enzym, das Peptid und weitere niedermolekulare Substanzen werden mittels einer Sephadex G-50f Gelchromatographie abgetrennt. Nicht umgesetztes Peptid wird anschließend über RP-MPLC gereinigt und wieder zurückgewonnen. Die weitere Reinigung des Insulinderivats erfolgt über präparative RP-HPLC über eine Nucleosil 100-10C₈ (2,0 cm Durchmesser, 25,0 cm Länge mit einer Vorsäule von 5,0 cm (48,6% Ausbeute). MW: 5290,2

Synthese von B1,B1'-Sub-[Sar^{B26}]-Des-(B27-B30)-insulin-B26-amid Insulindimer

100 mg (18,9 μmol) N^αA¹-Msc-[Sar^{B26}]-des-(B27-B30)-Insulin-B26-amid werden unter Zusatz von 5,5 Äquivalenten HOBt in 400 μl DMSO, 8,7 μl DMF und 9,5 μl NMM gelöst. Nach 30 min. wird mit 0,6 Äquivalenten Korksäure-bis-ONSu-ester in fester Form versetzt und 8–30 h gerührt. Der gesamte Reaktionsansatz wird unter Zugabe von 300 μl Eisessig in 1,5 ml 10%ige Essigsäure aufgenommen und über Sephadex G-50f chromatographiert. Die Dimerfraktion wird lyophilisiert. Zur Abspaltung der Msc-Gruppen werden 100 mg Msc-geschütztes Protein in 5 ml eines Dioxan/Wasser-Gemisches (2/1, v/v) gelöst und auf 0°C gekühlt. Es wird mit 514 μl 2 N NaOH versetzt und 120 s bei 0°C gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2,2 ml Eisessig gestoppt. Der Reaktionsansatz wird über Sephadex G-25f gelchromatographiert und lyophilisiert (11,9% Ausbeute).

Die Charakterisierung der Zwischenprodukte und des Endprodukts erfolgte mittels RP-HPLC, saurer CZE sowie MALDI-TOF Massenspektrometrie (Tabelle 1).

Tab. 1

Ausbeuten, Reinheiten nach RP-HPLC sowie CZE und Massen bei der Synthese von B1,B1'-Sub-[Sar^{B26}]-Des-(B27-B30)-Insulin-B26-amid Insulindimer

Derivat	Ausbeute [%]	Reinheit [%] nach		MW [g/mol]	
		RP-HPLC	CZE	kalk.	gem.
Gly-Phe-Phe-Sar-NH ₂	82,6	98,5	>99	442,5	463,2*
A1-Msc-DOI-Gly-Phe-Phe-Sar-NH ₂	48,6	95,6	>99	5441,2	5439
B1,B1'-Sub-DOI-Gly-Phe-Phe-Sar-NH ₂ -Dimer	14,4	90	>99	10.720	10.710

* Addukt mit Natrium (M = 23)

Erfindungsbeispiel 2

Synthese von B1,B1'-Sub-[D-Ala^{B26}]-Des-(B27-B30)-Insulin-B26-amid Insulindimer

Die Synthese dieses verkürzte Insulindimer erfolgte analog zur der bei Erfindungsbeispiel 1 beschriebenen Synthese mit der Ausnahme, daß das synthetische Tetrapeptid Gly-Phe-Phe-D-Ala-NH₂ verwendet wurde. In Tabelle 2 sind die entsprechenden Ausbeuten, Reinheiten und Massen wiedergegeben.

Tab. 2

Ausbeuten, Reinheiten nach RP-HPLC sowie CZE und Massen bei der Synthese von B1,B1'-Sub-[D-Ala^{B26}]-Des-(B27-B30)-Insulin-B26-amid Insulindimer

Derivat	Ausbeute [%]	Reinheit [%] nach		MW [g/mol]	
		RP-HPLC	CZE	kalk.	gem.
Gly-Phe-Phe-D-Ala-NH ₂	61,6	99,1	>99	442,5	463,2*
A1-Msc- DOI-Gly-Phe-Phe-D-Ala-NH ₂	53,9	95,1	>99	5441,2	5439,4
B1,B1'-Sub-DOI-Gly-Phe-Phe-D-Ala-NH ₂ -Dimer	11,9	88,1	>99	10.720	10.713

* Addukt mit Natrium

Erfindungsbeispiel 3

Synthese von B1,B1'-Sub-[Glu^{B26}]-Des-(B27-B30)-Insulin-B26-amid Insulindimer

Die Synthese dieses verkürzte Insulindimer erfolgte analog zur der bei Erfindungsbeispiel 1 beschriebenen Synthese mit der Ausnahme, daß das synthetische Tetrapeptid Gly-Phe-Phe-Glu-NH₂ verwendet wurde. Tabelle 3 zeigt die entsprechenden Ausbeuten, Reinheiten und Massen.

Tab. 3

Ausbeuten, Reinheiten nach RP-HPLC sowie CZE und Massen bei der Synthese von B1,B1'-Sub-[Glu^{B26}]-Des-(B27-B30)-Insulin-B26-amid Insulindimer

Derivat	Ausbeute [%]	Reinheit [%] nach		MW [g/mol]	
		RP-HPLC	CZE	kalk.	gem.
Gly-Phe-Phe-Glu-NH ₂	74,9	94,5	>99	499,2	498,3
A1-Msc- DOI-Gly-Phe-Phe-Glu-NH ₂	38,6	95,7	>99	5498,2	5497,6
B1,B1'-Sub-DOI-Gly-Phe-Phe-Glu-NH ₂ -Dimer	15,8	>99	>99	10.826	10.833

Erfindungsbeispiel 4

Biologische Eigenschaften zu den Erfindungsbeispielen 1-3

Die biologischen Eigenschaften der in den Erfindungsbeispielen 1-3 beschriebenen Dimere B1,B1'-Sub-[Sar, D-Ala oder Glu^{B26}]-Des-(B27-B30)-Insulin-B26-amid Dimer wurden einerseits, anhand der Rezeptorbindung andererseits anhand der Bioaktivität *in vitro* ermittelt.

Die Bestimmung der Rezeptorbindung erfolgte mittels Verdrängungsstudien an IM-9 Lymphozyten. Die relative biologische Aktivität wurde an kultivierten 3T3-L1 Adipozyten in Form des Glukosetransports bestimmt. In Tabelle 4 sind die Bindungsaffinitäten sowie die relativen biologischen Aktivitäten der synthetisierten Insulindimere wiedergegeben.

Relative Rezeptorbindung (bestimmt an IM-9 Lymphozyten) sowie relative biologische Aktivitäten (bestimmt an kultivierten 3T3-L1 Adipozyten) sämtlicher Insulindimere im Vergleich zu nativem Insulin

Dimer	R I. Rez pt r- bindung [%]	R I. biol. Aktivität [%]
B1,B1'-Sub-[Sar ^{B26}]-Des-(B27-B30)- insulin-B26-amid Insulindimer	412 ± 94,8	1957 ± 575
B1,B1'-Sub-[D-Ala ^{B26}]-Des-(B27- B30)-insulin-B26-amid Insulindimer	357 ± 53,6	814 ± 184
B1,B1'-Sub-[Glu ^{B26}]-Des-(B27-B30)- insulin-B26-amid Insulindimer	176 ± 45,8	817,5 ± 224

Literatur

1. J. Marschall, S. Havelund, P. Kurtzhals, A. A. Andersen, J. Halstrøm, E. Hasselager, U. D. Larsen, U. Ribel, L. Schäfer, K. Val, I. Jonassen, Diabetologia 1996, 39, S. 281-288.
2. Europäisches Patent EP 0 383 472 B1.
3. S. Garavito, Physiol. Rev. 1984, 64, S. 1321.
4. A. Schüttler, D. Brandenburg, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 1982, 363, S. 317-330.
5. M. Weiland, C. Brandenburg, D. Brandenburg, H. G. Joost, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87, S. 1154-1158.
6. M. Bremer, M. Weiland, W. Becker, D. Müller-Wieland, R. Streicher, M. Fabry, H. G. Joost, Molecular Pharmacology 1993, 44, S. 271-276.
7. I. Shepce Morad, N. C. Jackson, M. Boroujerdi, D. Brandenburg, P. H. Sönksen, R. H. Jones, Diabetologia 1995, 38, S. 1007-1013.
8. M. A. Tamm, R. H. Jones, K. P. Willey, A. Schüttler, D. Brandenburg, Biochem. J. 1983, 216, S. 687-694.

Patentansprüche

1. Insulinanaloga, die dadurch gekennzeichnet sind, daß zwei Insulinmoleküle an den N-terminalen Aminogruppen der B-Kette über eine lineare bifunktionelle Carbonsäure variabler Länge kovalent miteinander verknüpft, im C-Terminus der B-Kette verkürzt und in Position B26 modifiziert sind [Sequenz 1].
2. Insulinanaloga nach Anspruch 1, bei denen die Verknüpfung aus einer verzweigten bifunktionellen Carbonsäure variabler Länge besteht [Sequenz 2].
3. Insulinanaloga nach Anspruch 1, bei denen die Verknüpfung aus einer linearen oder einer verzweigten bifunktionellen Carbonsäure variabler Länge besteht, die Aminosäure in Position B26 variiert wird und C-terminal eine Carboxylgruppe vorhanden ist [Sequenz 3].
4. Insulinanaloga nach Anspruch 1, bei denen die Verknüpfung aus einer linearen oder einer verzweigten bifunktionellen Carbonsäure variabler Länge besteht, die Aminosäure in Position B26 variiert wird und die C-terminale Carboxylgruppe amidiert ist [Sequenz 4].
5. Ein hoch potentes Insulinanalogon nach Anspruch 1, bei dem die Brücke aus Korksäure besteht und sich in Position B26 Sarkosin-amid befindet [Sequenz 5].
6. Insulinanaloga nach Anspruch 1, bei denen zwei unterschiedlich modifizierte Insulinmoleküle mittels einer linearen oder einer verzweigten bifunktionellen Carbonsäure variabler Länge asymmetrisch miteinander verknüpft sind [Sequenz 6].
7. Ein Insulinanalogon nach Anspruch 1, bei dem zwei Moleküle Des-(B26-B30)-insulin-B26-amid mittels einer linearen oder einer verzweigten bifunktionellen Carbonsäure über die Positionen Phe^{B1} und Phe^{B1'} miteinander verknüpft sind [Sequenz 7].
8. Pharmazeutische Zubereitungen, dadurch gekennzeichnet, daß sie neben einem Analogon nach Anspruch 1-7 Zusätze wie Zinkionen, Phenol, m-Kresol, Glycerin, Puffersubstanzen und andere Additive enthalten.
9. Eine Methode zur Behandlung von Diabetes-Patienten durch Verabreichung einer pharmazeutischen Zusammenstellung einer therapeutisch effektiven Menge eines der nach Anspruch 1-7 beschriebenen Insulinanaloga in Kombination mit einem Additiv nach Anspruch 8.
10. Eine Methode nach Anspruch 9, bei der das Insulinanalogon intramuskulär verabreicht wird.
11. Eine Methode nach Anspruch 9, bei der das Insulinanalogon subcutan verabreicht wird.
12. Eine Methode nach Anspruch 9, bei der das Insulinanalogon intravenös verabreicht wird.
13. Eine Methode nach Anspruch 9, bei der das Insulinanalogon mit Hilfe einer externen oder implantierten Pumpe

verabreicht wird.

14. Eine Methode nach Anspruch 9, bei der das Insulinanalogon nasal verabreicht wird.

15. Eine Methode nach Anspruch 9, bei der das Insulinanalogon nach der Inhalationstherapie verabreicht wird.

16. Diagnosekits auf Basis von Analoga nach Anspruch 1-7.

5

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

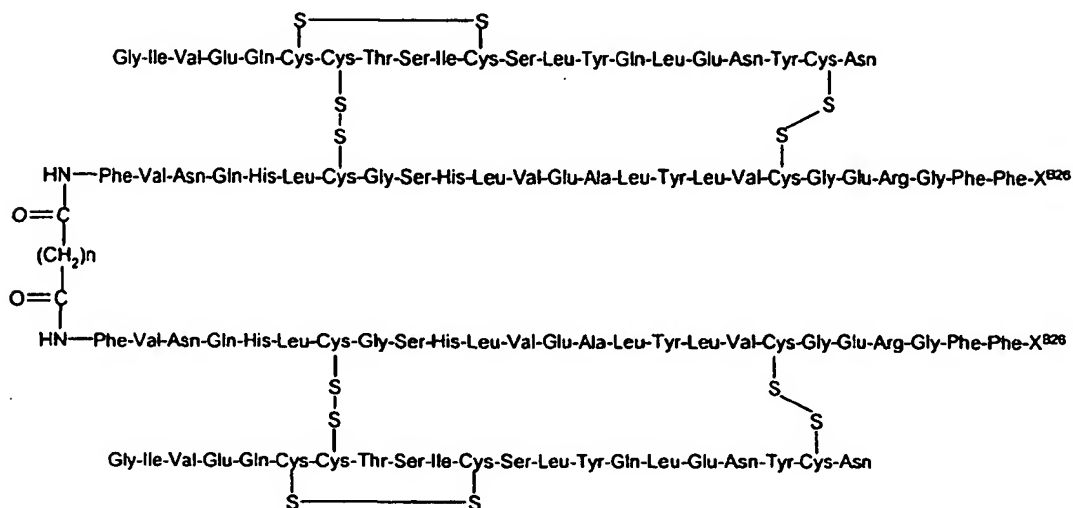
65

Sequenz 1

X = O-Alkyl, O-Aryl, NRR', Aminosäure oder deren Derivat, Alkyl- oder Arylrest

R, R' = H, Alkyl- oder Arylrest

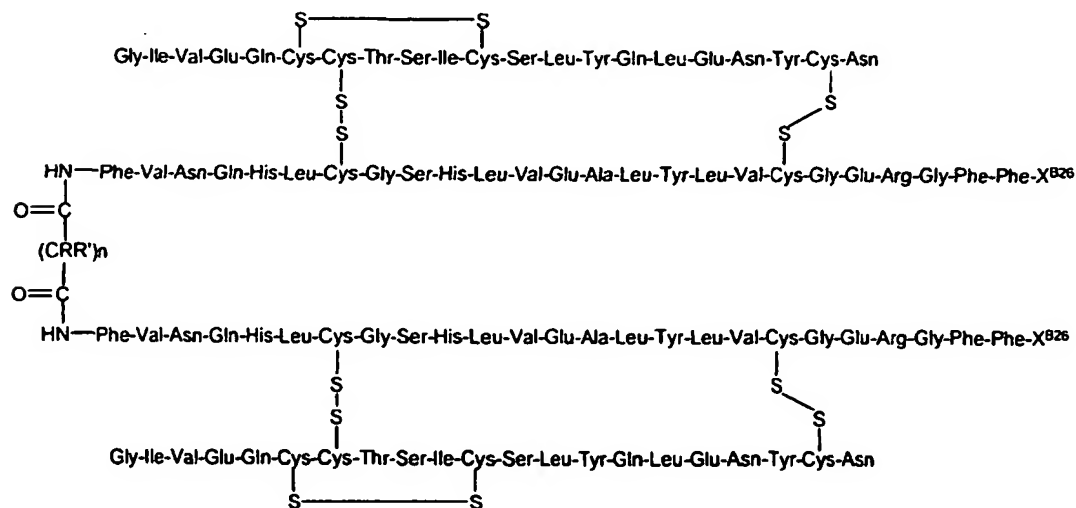
n = 0, 1, 2, ...

**Sequenz 2**

X = O-Alkyl, O-Aryl, NRR', Aminosäure oder deren Derivat, Alkyl- oder Arylrest

R, R' = H, NH₂, Alkyl- oder Arylrest

n = 0, 1, 2, ...



Sequenz 3

X = Aminosäure oder deren Derivat

R, R' = H, NH₂, Alkyl- oder Arylrest

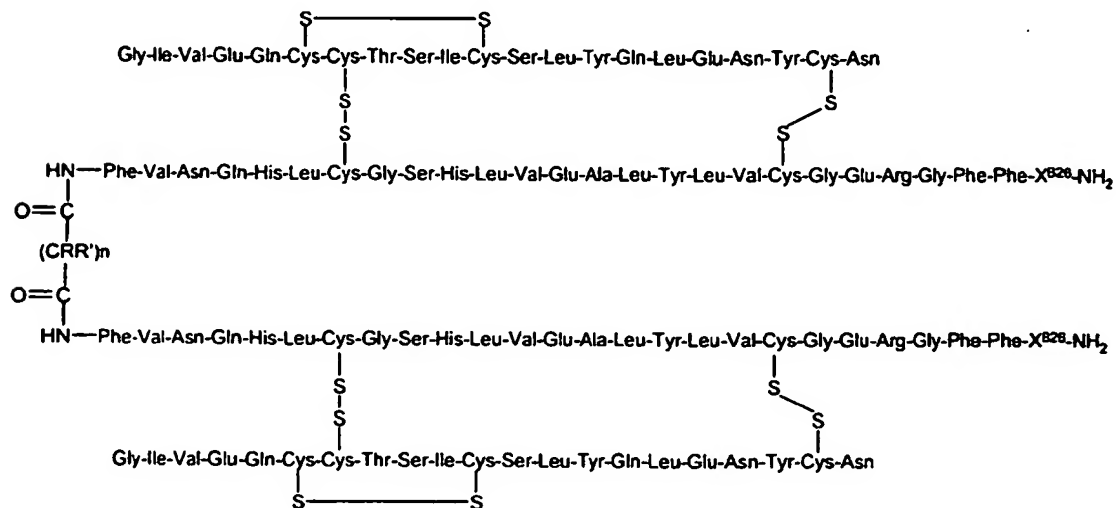
n = 0, 1, 2, ...

**Sequenz 4**

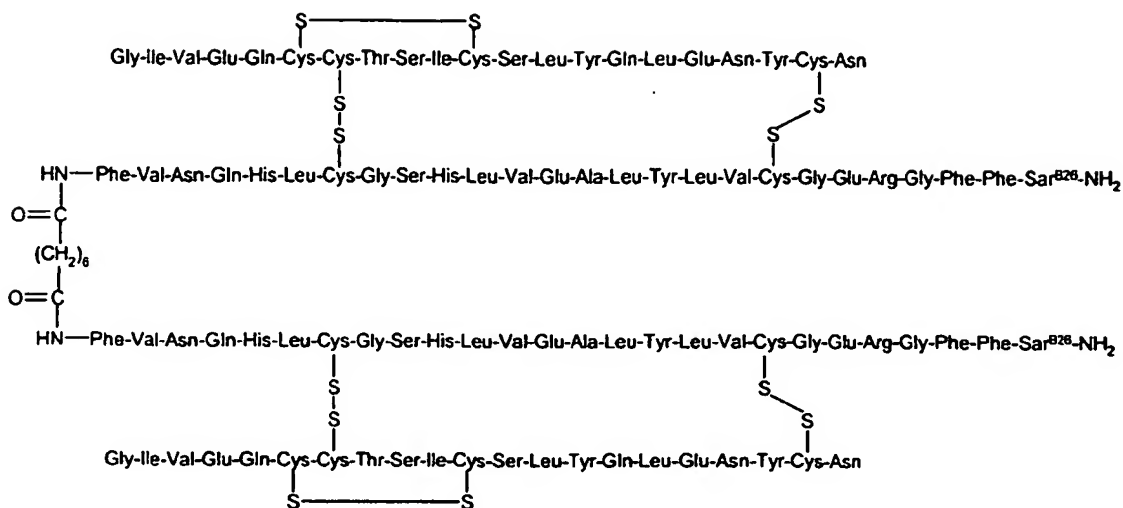
X = Aminosäure oder deren Derivat

R, R' = H, NH₂, Alkyl- oder Arylrest

n = 0, 1, 2, ...



Sequenz 5

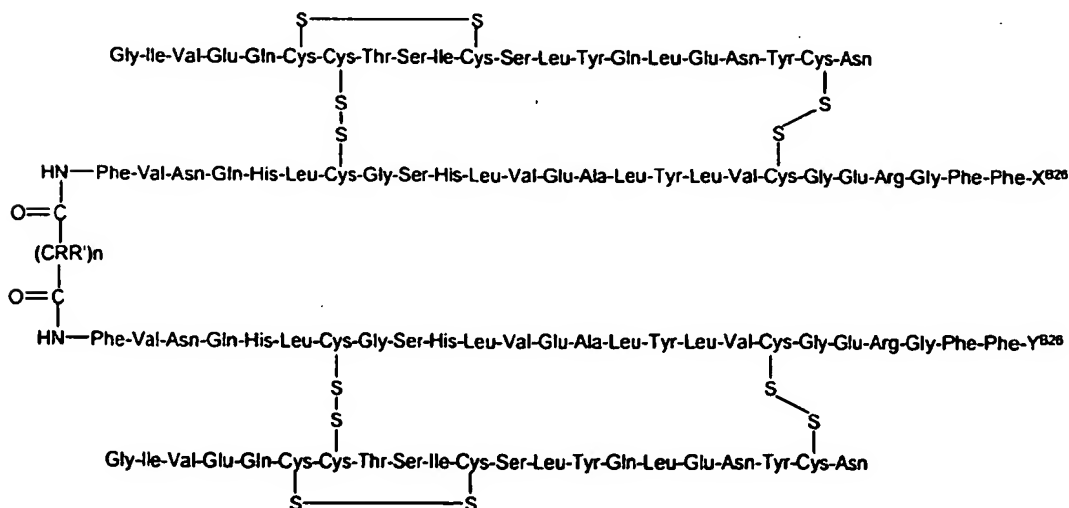


Sequenz 6

X, Y = OH, O-Alkyl, O-Aryl, NRR', Aminosäure oder deren Derivat,
Alkyl- oder Arylrest

R, R' = H, NH₂, Alkyl- oder Arylrest

n = 0, 1, 2, ...



Sequenz 7R, R' = H, NH₂, Alkyl- oder Arylrest

n = 0, 1, 2, ...

